

添加有扩增内标的沙门氏菌荧光定量 PCR 检测体系的建立与评价

但现龙, 刘斌, 李小玲, 张利达, 施春雷, 周敏, 史贤明*

(上海交通大学农业与生物学院, 陆伯勋食品安全研究中心, 中美食品安全联合研究中心, 上海 200240)

摘要 【目的】建立添加有扩增内标(IAC, Internal amplification control)的沙门氏菌 EvaGreen 荧光定量 PCR 检测体系, 提高 PCR 检测可靠性。【方法】通过比较已有沙门氏菌属细菌的基因组序列, 筛选沙门氏菌属特异检测靶点, 设计特异引物; 再用复合引物法构建扩增内标, 优化参数, 建立沙门氏菌内标 PCR 检测体系, 利用特异性和灵敏度实验评价体系的检测性能。【结果】筛选得到的新特异靶点基因编码 III 型分泌系统蛋白(ssaQ)。针对该基因设计特异引物(SsaQ6), 建立了添加有扩增内标的常规 PCR 和 EvaGreen 荧光定量 PCR 检测体系; 二者对 151 株沙门氏菌和 34 株非沙门氏菌的检测符合率均达 100%, 对基因组 DNA 的检测下限达 14.9 拷贝/PCR 和 2.76 拷贝/PCR; 人工污染牛奶样品(初始染菌量: 4–6 cfu/10 mL), 增菌 10 h 和 8 h 后分别可检出沙门氏菌。【结论】本研究发掘的新靶点基因 ssaQ 特异性强, 基于这一新靶点建立的添加有扩增内标的 EvaGreen 荧光定量 PCR 比常规内标 PCR 的检测限更低, 重复性更好, 快速方便, 在 12 h 内即可得出检测结果, 并且定量准确, 有利于推进沙门氏菌 PCR 检测方法的标准化应用。

关键词: 沙门氏菌, 靶点筛选, EvaGreen 荧光定量 PCR, 扩增内标

中图分类号: TS20717 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 08-1119-09

沙门氏菌(*Salmonella*)是一类重要的食源性致病菌, 广泛存在于家畜、家禽等动物的体内及其排泄物污染的环境中^[1], 至今因感染沙门氏菌引起的食物中毒病例在世界各地的食物中毒中仍居于首位或第二位^[2]。人体感染沙门氏菌后能够引发伤寒、副伤寒、败血症、急性胃肠炎等病症, 严重威胁人类健康, 因此, 亟待加强对沙门氏菌检测监控技术的开发。

目前, 我国食品检测部门大多仍采用传统的培养法来检测致病菌, 操作复杂、检测周期长, 远远不能满足当今食品检测的需求。而基于聚合酶链式反应(PCR)的检测方法由于具有快速、灵敏、准确等优

点, 现已广泛应用于沙门氏菌的检测^[2]。但是, 目前常用的沙门氏菌检测靶点如 *invA*、*ompC*、*sdiA*、*stn* 等基因, 存在特异性不强或灵敏度不高的问题, 使得检测准确性降低^[3–8]。此外, 抑制剂和交叉污染等因素也可能造成假阴性和假阳性的结果, 严重降低了 PCR 技术的重复性与可靠性, 极大的限制了 PCR 检测技术的应用和发展^[9–11]。

为了克服上述问题, 本研究开展了以下改进工作: (1) 利用生物信息学手段, 发掘出高度保守的沙门氏菌属特异检测靶点(ssaQ), 检测靶点是 PCR 检测方法建立的关键, 高品质的靶点可以有效的避免

基金项目: 国家自然科学基金(30771792, 31000779); “十一五”国家科技支撑计划“食品质量安全控制关键技术研究”重点项目(2009BADB9B01)

* 通信作者 Tel: +86-21-34206616; E-mail: xmshi@sjtu.edu.cn

作者简介: 但现龙(1986–), 男, 安徽人, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全。E-mail: danielxl2010@gmail.com

收稿日期: 2011-02-10; 修回日期: 2011-05-04

漏检、错检,减少假阴性、假阳性结果^[2]; (2) 人工构建扩增内标,建立添加有扩增内标的常规 PCR 检测体系,扩增内标可以有效的指示由抑制剂等因素引起的假阴性结果^[6,12]; (3) 尝试将扩增内标技术与染料荧光技术结合,首次建立了添加有扩增内标的沙门氏菌 EvaGreen 荧光定量 PCR 检测体系,有效减少了假阳性和假阴性现象的出现,并克服了染料法定量和添加内标间的矛盾,实现了准确定量,同时,其自动化程度高、耗时短、操作方便,极大地增加了检测结果的重现性和可靠性,易于标准化推广应用^[13-15]。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、10 × PCR buffer、Mg²⁺ (MBI

Fermentas); dNTPs、DNA marker(北京天根生化科技有限公司); 质粒提取试剂盒(爱思进生物技术(杭州) 有限公司); 载体 pMD19-T、2 × Premix Ex TaqTM (宝生物工程(大连) 有限公司)、20 × EvaGreen (Biotium ,INC); PCR 扩增仪(MJ Research Minicycle PTC-200); Bio-Rad Chrome4TM (Bio-Rad Laboratories , INC); 紫外核酸与蛋白质分析仪(Beckman Coulter DU800); Primer Premier 5.0 软件(Premier Biosoft International), SPSS Statistics V17.0 (SPSS ,INC) 。

1.2 实验菌株

151 株沙门氏菌(阳性菌株) 及 34 株非沙门氏菌(阴性菌株),其中标准菌株购于中国科学院微生物研究所和中国医学微生物菌种保藏中心,其余均为上海交通大学陆伯勋食品安全研究中心食品安全与微生物研究室保存菌株(表 1) 。

表 1 本研究所用菌株及 PCR 检测结果

Table 1 Bacterial strains used in this study and their PCR results

| Bacterial species | Strain No. | No. of strains | PCR results | | | | Bacterial species | Strain No. | No. of strains | PCR results | | | |
|---------------------------------------------------|-------------|----------------|-------------|----|-----------|-----------|--------------------------------|------------|----------------|-------------|----|-----------|-----------|
| | | | SsaQ6 | PS | s18 – s19 | 139 – 141 | | | | SsaQ6 | PS | s18 – s19 | 139 – 141 |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> | | | | | | | <i>Citrobacter freundii</i> | ATCC8090* | 1 | – | – | ND | ND |
| | | | | | | | <i>Enterococcus avium</i> | ATCC14025 | 1 | – | – | ND | ND |
| Typhi | CMCC50098 | 1 | + | + | + | + | <i>Enterococcus faecalis</i> | ATCC49452 | 1 | – | – | ND | ND |
| Typhi | CMCC50180 | 1 | + | + | + | + | <i>Enterococcus faecium</i> | ATCC27270 | 1 | – | – | ND | ND |
| Typhimurium | AS1. 1174 | 1 | + | + | + | + | <i>Enterobacter cloacae</i> | ATCC13047* | 1 | – | – | ND | ND |
| Typhimurium | ATCC51812 | 1 | + | + | + | + | <i>Enterobacte cloacae</i> | ATCC700323 | 1 | – | – | ND | ND |
| Typhimurium | ATCC14028* | 1 | + | + | + | + | <i>Enterobacter sakazakii</i> | ATCC50205 | 1 | – | – | ND | ND |
| Typhimurium | CMCC50115 | 1 | + | + | + | + | <i>Escherichia coli</i> | ATCC11246 | 1 | – | – | ND | ND |
| Paratyphi A | ATCC9150* | 1 | + | + | + | + | <i>Escherichia coli</i> | ATCC43889* | 1 | – | – | ND | ND |
| Paratyphi A | CMCC50093 | 1 | + | + | + | + | O157: H7 | | | | | | |
| Paratyphi B | DSM4220 | 1 | + | + | + | + | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC27336 | 1 | – | – | ND | ND |
| Paratyphi B | CMCC50004 | 1 | + | + | + | + | ATCCBAA | | | | | | |
| Paratyphi B | CMCC50094* | 1 | + | + | + | + | – 751* | | 1 | – | – | ND | ND |
| Paratyphi C | CMCC50017* | 1 | + | + | + | + | <i>Listeria monocytogenes</i> | ATCC50002 | 1 | – | – | ND | ND |
| Enteritidis | CMCC50335 | 1 | + | + | + | + | <i>Listeria monocytogenes</i> | ATCC15313 | 1 | – | – | ND | ND |
| Enteritidis | ATCC13076* | 1 | + | + | + | + | <i>Micrococcus luteus</i> | ATCC9341 | 1 | – | – | ND | ND |
| Enteritidis | ATCC49214 | 1 | + | + | + | + | <i>Proteus mirabilis</i> | ATCC12453 | 1 | – | – | ND | ND |
| Choleraesuis | AS1. 1190 | 1 | + | + | + | + | <i>Proteus vulgaris</i> | ATCC33425 | 1 | – | – | ND | ND |
| Choleraesuis | ATCC10708 | 1 | + | + | + | + | | | | | | | |
| Choleraesuis | ATCC7001* | 1 | + | + | + | + | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | CDCB32116 | 1 | – | – | ND | ND |
| Infantis | ATCC51741* | 1 | + | + | + | + | <i>Proteus mirabilis</i> | ATCC12453* | 1 | – | – | ND | ND |
| Tallahassee | ATCC12002 | 1 | + | + | + | + | <i>Serratia marcescens</i> | ATCC21740* | 1 | – | – | ND | ND |
| Anatum | ATCC9270* | 1 | + | + | + | + | <i>Shigella flexneri</i> | CMCC51311* | 1 | – | – | ND | ND |
| Vellore | ATCC15611 | 1 | + | + | + | + | <i>Shigella dysenteriae</i> | CMCC51335* | 1 | – | – | ND | ND |
| Abony | NCTC6017 | 1 | + | + | + | + | <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC27664* | 1 | – | – | ND | ND |
| Poona | NCTC4840 | 1 | + | + | + | + | <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC25923 | 1 | – | – | ND | ND |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> | | | | | | | <i>Vibro alginolyticus</i> | ATCC33810 | 1 | – | – | ND | ND |
| <i>arizonae</i> | ATCC13314* | 1 | + | + | + | + | <i>Vibro anguillarum</i> | SJTUF33001 | 1 | – | – | ND | ND |
| <i>Salmonella</i> spp. | SJTUF12237* | 1 | + | + | + | + | <i>Vibro cholerae</i> | ATCC25871 | 1 | – | – | ND | ND |
| <i>Salmonella</i> spp. | SJTUF12271* | 1 | + | + | + | + | <i>Vibro damsela</i> | SJTUF34001 | 1 | – | – | ND | ND |
| <i>Salmonella</i> spp. | | 124 | + | + | + | + | <i>Vibro fluvialis</i> | ATCC33810 | 1 | – | – | ND | ND |
| <i>Bacillus mengateriums</i> | ATCC19218* | 1 | – | – | ND | ND | <i>Vibro mimicus</i> | ATCC33653 | 1 | – | – | ND | ND |
| <i>Bacillus subtilis</i> | ATCC6633 | 1 | – | – | ND | ND | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | ATCC33846* | 1 | – | – | ND | ND |
| | | | | | | | <i>Vibrio vulnificus</i> | ATCC27542* | 1 | – | – | ND | ND |
| | | | | | | | SGL | | 1 | – | – | ND | ND |

Results of PCR: positive (+) & negative (-) indicate the presence and absence of target products respectively; * indicates strains used for primers selection and real-time PCR test; ND: not detected; a: indicates some weak bands have been observed.

1.3 沙门氏菌基因组 DNA 的提取及其纯度测定

参见文献^[16]提取沙门氏菌基因组 DNA, 无菌水稀释 10 倍后, 用 DU800 紫外分光光度计在波长 260 nm 和 280 nm 下测定其纯度与浓度, 剩余 DNA 原液置于 -20℃ 保存。

1.4 引物筛选及其特异性验证

利用生物信息学方法, 对沙门氏菌属内及各属间的基因组 DNA 序列进行比对, 找到 200 条沙门氏菌属内保守属间特异的靶序列。针对这些特异片段, 用软件 Primer Premier 5.0 进行引物设计; 最终得到 200 对引物(数据略), 再对这些引物进行 PCR 扩增验证(所用菌株见表 1), 同时以沙门氏菌常用检测基因 *invA* 和 *ompC* 对应的引物 PS^[17], 139-141^[3] 和 s18-s19^[5] 作为对照(表 2), 最终筛选出 15 对性能优异的沙门氏菌属特异检测引物, 选取其中最好的引物 SsaQ6 建立 PCR 检测体系。

表 2 引物及序列

| Table 2 Sequences of all primers used in this study | | |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------|-----------|
| ID of Primers | Sequence(5'→3') | Length/bp |
| ZDS | GTGACCGCCGATGCGTATGT | 20 |
| | CTTGACCACGCTGTGCCACTT | 21 |
| SsaQ6 | CACAGGAGGAGCAGGATAA | 19 |
| | CCAGTACAGCAAGGGACAT | 19 |
| IAC6 | <u>CACAGGAGGAGCAGGATAA</u> AGTG | 39 |
| | ACCGCCGATGCGTATGT | |
| | CCAGTACAGCAAGGGACAT <u>CTT</u> | 40 |
| PS | GACCAAGCTGTGCCACTT | |
| | TGTCACCGTGCTCCAGTTTA | 20 |
| 139-141 | CGACAAGACCATCACCAATG | 20 |
| | GTGAAATTATCGCCACGTTCCG | 26 |
| s18-s19 | GCAA | 22 |
| | TCATCGCACCGTCAAAGGAACC | 21 |
| | ACCGTAACGCTCGCCTGTAT | 24 |
| | AGAGTGACGCGGTGTGTCGCGTT | |

Underline indicates SsaQ6L and SsaQ6R respectively.

1.5 扩增内标的构建

采用复合引物法^[18]构建扩增内标, 构建过程如图 1 所示: 选择原壳小球藻 *zds* 基因(Accession No. GU269622), 设计扩增内标引物 ZDSL 和 ZDSR(表 2), 在其 5' 末端分别连接上目标检测引物, 形成一对约 40 bp 的长引物 IAC6L 和 IAC6R(表 2), 经长引物 PCR 扩增后得到 468 bp 的扩增内标。内标片段连接载体 pMD₁₉-T 转化感受态细胞 DH5α, 测序验证; 提取质粒, 按方法 1.3 测定浓度, -20℃ 保存备用, 菌液于甘油管中 -70℃ 保存。

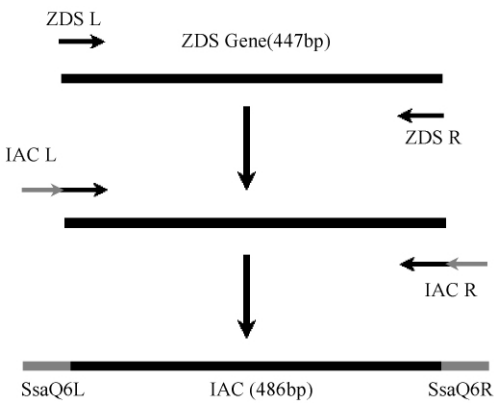


图 1 IAC 构建示意图

Fig. 1 Scheme of IAC construction by the compound primers technology

1.6 PCR 扩增

1.6.1 常规 PCR 反应体系: 10 × PCR Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L 的 MgCl₂ 2 μL, 2.5 mmol/L 的 dNTP 1 μL, 10 μmol/L 的引物各 0.5 μL, 模板 2-5 μL, 1 U/μL 的 TaqDNA 聚合酶 1 μL, 补水至 25 μL, 扩增内标根据具体情况按优化好的浓度添加; 反应程序: 94℃ 预变性 5 min, 接着反应 35 个循环, 每个循环包括 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 循环结束后, 72℃ 延伸 10 min; 反应产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测并观察结果。

1.6.2 Real time PCR 反应体系: 2 × Premix 12.5 μL, 20 × EvaGreen 染料 1.25 μL, 10 μmol/L 的引物各 0.5 μL, 模板 5 μL, 补水至 25 μL, 扩增内标根据具体情况按优化后的浓度添加; 反应程序: 95℃ 预变性 1 min, 接着反应 45 个循环, 每个循环包括 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 20 s, 在 77℃ 时读板 2 s; 循环结束后绘制熔解曲线: 从 68℃ 梯度升温至 95℃, 每隔 1℃ 读板一次, 持续 2 s。

1.7 灵敏度评价

1.7.1 基因组 DNA 灵敏度评价: 将已知浓度的沙门氏菌标准菌株基因组 DNA 10 倍梯度稀释, 每个稀释度各取 5 μL 为模板, 按 1.6 所述条件, 进行 PCR 扩增, 能得到肉眼可见条带或明显扩增曲线的最低浓度梯度即为 PCR 检测体系灵敏度。

1.7.2 纯培养物检测灵敏度评价: 沙门氏菌标准菌株经 8 h 纯培养后, 用 LB 培养基作 10 倍梯度稀释, 并选择 10⁻⁵、10⁻⁶ 和 10⁻⁷ 这 3 个稀释度做平板计数, 以此计算原始菌落数。同时每个稀释度各取 1 mL 菌液, 用水煮法提取 DNA, 取 5 μL 为模板, 按 1.6 所述条

件,进行 PCR 扩增。

1.7.3 扩增内标对沙门氏菌检测灵敏度的影响: 将含有扩增内标的质粒 10 倍梯度稀释,按方法 1.7.1 做灵敏度实验,以出现肉眼可见扩增条带的最后 3 个浓度梯度作为检测体系中内标的添加量,考察内标的添加量对基因组 DNA 灵敏度的影响。

1.8 EvaGreen 荧光定量 PCR 检测结果准确性评价

将沙门氏菌标准菌株 ATCC13076 基因组 DNA 10 倍梯度稀释,每个稀释度各取 5 μL 为模板,按方法 1.6.2 进行荧光定量 PCR 扩增(3 个平行),以 C_t 值为横坐标,DNA 模板量的对数为纵坐标绘制标准曲线。

再以 10 倍梯度稀释的 ATCC13076 基因组 DNA 为模板,加入优化好的内标添加量,进行荧光定量 PCR 扩增,独立重复 3 次,评价实验结果的重复性;再按标准曲线分别计算模板的浓度,并将计算值与理论值进行比较(t 检验),评价定量结果的可靠性。

1.9 人工污染食品样品检测

污染菌为猪霍乱沙门氏菌 ATCC13312、乙型副伤寒沙门氏菌 CMCC50094。从甘油管中取出标准菌株复苏 8 h,后转接 LB 增菌 8 h,10 倍梯度稀释;选择 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 3 个稀释度做平板计数,计算原始菌落数后,取 4 个浓度(0,0-1,1-10,10-100 cfu/mL)的菌液各 1 mL 与 10 mL 的牛乳、89 mL 的液体 LB 培养基混合,在 37°C 、150 r/min 条件下培养 12 h,每隔 2 h 取样 1 次,水煮法提取 DNA^[7], -20°C 保存备用。

2 结果

2.1 沙门氏菌基因组 DNA 及扩增内标质粒 DNA 的浓度测定

沙门氏菌标准菌株 ATCC13076、ATCC14028、ATCC9270 基因组 DNA 按 1.3 测定浓度,测得其 DNA 含量分别为 27.6 ng/ μL 、17.8 ng/ μL 、14.9 ng/ μL ;含有扩增内标的质粒 DNA 的浓度为 12.4 ng/ μL ,按文献[19]中的公式计算得 3.53×10^9 拷贝/ μL 。

2.2 特异性评价

以建立的常规内标 PCR 检测体系对表 1 所列的 151 株沙门氏菌及 34 株非沙门氏菌进行检测,结果显示,以沙门氏菌基因组 DNA 为模板皆能扩增出 381 bp 的目的产物,而以非沙门氏菌基因组 DNA 为

模板时仅能扩增出 486 bp 的内标片段(表 1)。而对照引物 139-141 和 s18-s19 对部分分离菌株扩增时,会出现扩增条带很弱的情况,并且不同公司的试剂扩增结果有较大差异。以 EvaGreen 内标荧光定量 PCR 检测体系对表 1 中星号标记的 11 株沙门标准菌株及 12 株非沙门氏菌进行检测,所有沙门氏菌的熔解曲线均在 85°C 出现一个目标条带特异溶解峰,所有非沙门氏菌的熔解曲线在 89°C 出现一个内标条带溶解峰,这表明,引物 SsaQ6 的特异性强,并且稳定性良好。

2.3 添加有扩增内标的 PCR 检测体系灵敏度评价

按方法 1.7.1 评价引物 SsaQ6 的灵敏度,对于常规内标 PCR 体系,在基因组 DNA(ATCC13076、ATCC14028、ATCC9270)浓度分别为 27.6 fg/ μL (图 2-A)、17.8 fg/ μL 和 14.9 fg/ μL 时均能看到一条明显的扩增条带;说明引物 SsaQ6 的常规 PCR 检测下限为 14.9 拷贝/PCR^[19]。对照引物 PS,139-141 的检测限与 SsaQ6 处于相同的数量级,而 s18-s19 的检测下限则只能达到 276 拷贝/PCR,远高于引物 SsaQ6 的水

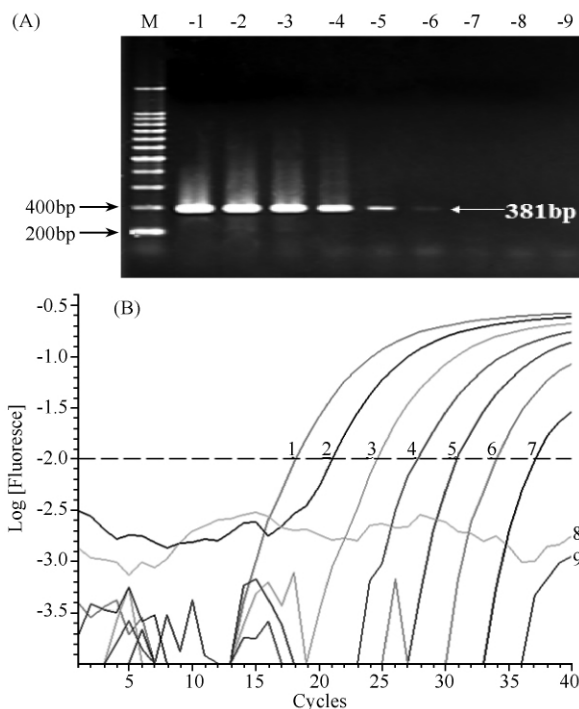


图 2 沙门氏菌基因组 DNA 灵敏度的评价

Fig. 2 Detection sensitivity of ATCC13076 purified genomic DNA. A: Detection sensitivity of Conventional PCR; B: Detection sensitivity of EvaGreen real-time PCR. Concentrations of ATCC13076 genomic DNA 1-9: 2.76 ng/ μL , 276 pg/ μL , 27.6 pg/ μL , 2.76 pg/ μL , 276 fg/ μL , 27.6 fg/ μL , 2.76 fg/ μL , 276 ag/ μL , ddH₂O, respectively. M: 200 bp ladder marker.

平。EvaGreen 荧光定量 PCR 检测体系在模板浓度为 $2.76 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 时 (ATCC13076), 存在明显的扩增曲线 (图 2-B), 则该荧光定量 PCR 检测体系的检测下限为 $2.76 \text{ 拷贝}/\text{PCR}$ 。

以沙门氏菌标准菌株 ATCC13076 纯培养物为模板, 按方法 1.7.2 评价引物灵敏度, 平板计数算得起始菌液浓度为 $2.2 \times 10^9 \text{ cfu/mL}$, 在稀释度 10^{-6} 时有肉眼可见的扩增条带, 则该引物纯培养物的灵敏度为 $2.2 \times 10^3 \text{ cfu/mL}$, 即 11 cfu/PCR 。

2.4 扩增内标添加量的选择

以标准菌株 ATCC13076 基因组 DNA 为模板, 按方法 1.6.2 来评价扩增内标对检测体系灵敏度的影响。预实验结果显示, 扩增内标的检测限为 $1.76 \times 10^2 \text{ 拷贝}/\text{PCR}$, 而内标添加量为 $1.76 \times 10^4 \text{ 拷贝}/$

PCR、 $1.76 \times 10^3 \text{ 拷贝}/\text{PCR}$ 时均对灵敏度有一定影响, 因此, 内标添加量应在 $1.76 \times 10^2 \text{ 拷贝}/\text{PCR} - 1.76 \times 10^3 \text{ 拷贝}/\text{PCR}$ 范围内进一步优化。

对于常规 PCR 体系, 内标的添加量分别为内标检测限的 4 倍、2 倍、1 倍 ($7.06 \times 10^2 \text{ 拷贝}/\text{PCR}$, $3.53 \times 10^2 \text{ 拷贝}/\text{PCR}$, $1.76 \times 10^2 \text{ 拷贝}/\text{PCR}$) 时, 检测体系的灵敏度均能达到 $27.6 \text{ 拷贝}/\text{PCR}$ (图 3-A)。在 EvaGreen 荧光定量 PCR 检测体系中, 内标添加量为 $1.76 \times 10^2 \text{ 拷贝}/\text{PCR}$ 时, 目标条带的熔解峰最明显 (图 3-B)。在确保内标能够清晰指示假阴性时, 尽量选择较低浓度, 使其对灵敏度的影响降到最低, 故最终选择常规检测体系内标的添加量为 $3.53 \times 10^2 \text{ 拷贝}/\text{PCR}$, EvaGreen 荧光定量 PCR 检测体系内标添加量最终确定为 $1.76 \times 10^2 \text{ 拷贝}/\text{PCR}$ 。

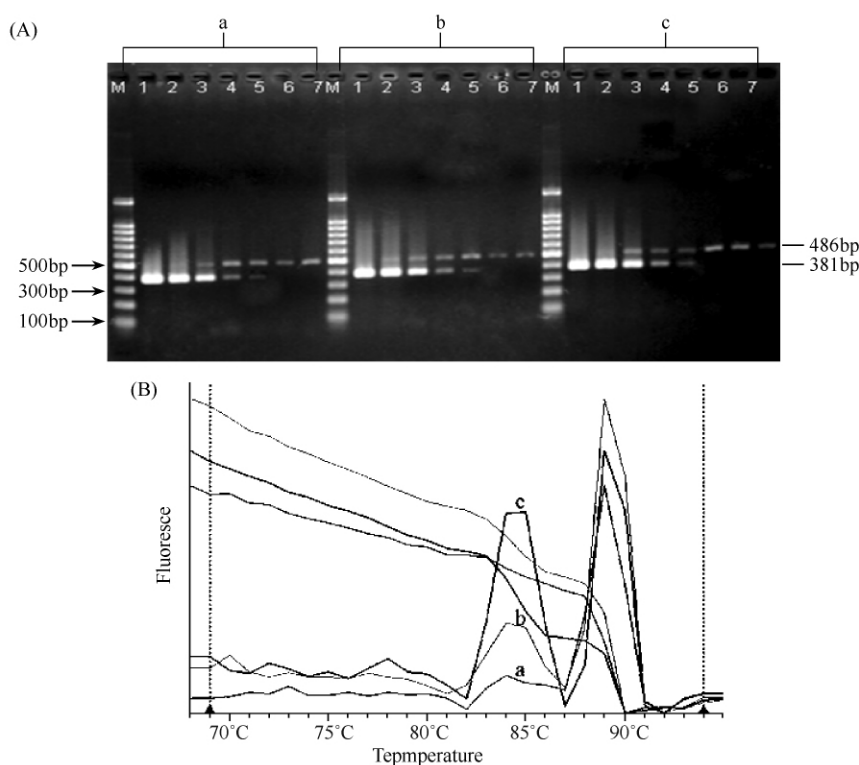


图 3 内标添加量的优化

Fig. 3 IAC optimization of PCR reaction. A: IAC optimization of conventional PCR; M: 100 bp ladder marker; Concentrations of ATCC 13076 purified genomic DNA Lane1 - 7: $276 \text{ pg}/\mu\text{L}$, $27.6 \text{ pg}/\mu\text{L}$, $2.76 \text{ pg}/\mu\text{L}$, $276 \text{ fg}/\mu\text{L}$, $27.6 \text{ fg}/\mu\text{L}$, $2.76 \text{ fg}/\mu\text{L}$, ddH₂O, respectively; B: IAC optimization of real-time PCR (Concentration of ATCC13076 purified genomic DNA: $138 \text{ fg}/\text{PCR}$), IAC Concentrations: a: $706 \text{ copies}/\text{PCR}$, b: $353 \text{ copies}/\text{PCR}$, c: $176.5 \text{ copies}/\text{PCR}$.

2.5 EvaGreen 荧光定量 PCR 检测结果的准确性

2.5.1 标准曲线的绘制: 根据方法 1.8 单独绘制标准曲线, 得到标准曲线方程为 $y = -0.3059x + 12.08$, 相关系数 $R^2 = 0.999$, 计算得扩增效率为 $E =$

102.256% [6]。这表明, 该曲线呈现良好的线性关系, 定量准确。

2.5.2 独立重复实验结果分析: 如表 3 所示, 梯度稀释 DNA 3 次独立重复实验 Ct 值的标准差均小于 1,

表 3 荧光定量 PCR 检测结果的准确性分析
Table 3 Quantization accuracy of *Salmonella* real-time PCR

| ATCC13076 Genome DNA(copies/PCR) | Ct ± SD (n =3) | DNA Quantity(Copies/PCR) | | <i>t</i> test P value |
|--------------------------------------|--------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|
| | | Means ^a | Reference ^b | |
| 2. 76E +06 | 19. 38 ±0. 15 | 2. 34E +06 | 2. 76E +06 | 0. 256 |
| 2. 76E +05 | 22. 29 ±0. 27 | 3. 28E +05 | 2. 76E +05 | 0. 422 |
| 2. 76E +04 | 25. 61 ±0. 02 | 3. 47E +04 | 2. 78E +04 | 0. 032 [*] |
| 2. 76E +03 | 28. 64 ±0. 37 | 4. 48E +03 | 2. 94E +03 | 0. 290 |
| 2. 76E +02 | 31. 32 ±0. 26 | 7. 32E +02 | 4. 52E +02 | 0. 197 |
| 2. 76E +01 | 32. 44 ±0. 49 | 5. 08E +02 | 2. 04E +02 | 0. 160 |
| 2. 76E +0 | 33. 36 ±0. 03 | 1. 84E +02 | 1. 79E +02 | 0. 838 |
| 0 | 33. 88 ±0. 13 | 1. 30E +02 | 1. 77E +02 | 0. 107 |

^a Indicate the calculated DNA quantity according to the standard curve; ^b The total DNA quantity of ATCC13076 Genome and IAC; ^{*} Indicates significant difference (P <0. 05) has been observed in *t* test.

说明检测结果重复性好; 计算结果与理论计数处于同一数量级水平, 仅有 1 个浓度呈现显著差异, 说明定量准确可靠。

2. 6 人工污染食品样品的检测

按方法 1. 8 进行人工污染实验, 根据平板计数结果计算得到标准株 ATCC13312 和 CMCC50094 的初始菌液浓度分别为 $6. 3 \times 10^9$ cfu/mL 和 $4. 2 \times 10^9$ cfu/mL, 则牛奶样品(10 mL) 中接入 3 个稀释度沙门氏菌的菌量约为 40 – 60 cfu, 4 – 6 cfu 和 0. 4 – 0. 6 cfu。分别用常规 PCR 体系和 EvaGreen 荧

光定量 PCR 检测体系进行检测, 结果如表 4 所示: 接菌量为 40 – 60 cfu 时, 增菌培养 8 h, 两种方法阳性检出率达 100%; 在接菌量为 4 – 6 cfu 时, 增菌培养 8 h, 荧光定量 PCR 阳性检出率高于常规 PCR, 增菌培养 10 h, 二者的阳性检出率均达到 100%; 在接菌量为 0. 4 – 0. 6 cfu 时, 常规 PCR 方法增菌 12 h 才有可能检测出阳性结果, 而荧光定量 PCR 在增菌 10 h 后即可检测出, 由此可见, 荧光定量 PCR 检测体系灵敏度更高, 结果更准确。

表 4 人工污染实验结果
Table 4 Detection results of artificially contaminated samples

| Strains | Time(h) | Results of conventional PCR | | | | | | Results of Real-time PCR | | | | | |
|-----------|----------|-----------------------------|---|---|---|---|---|--------------------------|---|---|---|---|---|
| | | A | A | B | B | C | C | A | A | B | B | C | C |
| CMCC50094 | 6 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| | 8 | + | + | + | – | – | – | + | + | + | – | – | – |
| | 10 | + | + | + | + | – | – | + | + | + | + | + | – |
| | 12 | + | + | + | + | – | – | + | + | + | + | + | + |
| ATCC13312 | 6 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| | 8 | + | + | + | – | – | – | + | + | + | + | – | – |
| | 10 | + | + | + | + | – | + | + | + | + | + | – | + |
| | 12 | + | + | + | + | – | + | + | + | + | + | + | + |

The original concentration of *Salmonella* strains used for artificial contamination: A: 40 – 60 cfu/10 mL; B: 4 – 6 cfu/10 mL; C: 0. 4 – 0. 6 cfu/10 mL; +: positive results, –: negative results.

3 讨论

性能优良的引物是建立准确可靠 PCR 检测体系的前提, 而优良的引物则依赖于高度特异的检测靶点, 因此, 确保检测靶点的特异性是本研究的主要目标。本实验室利用生物信息学技术初筛, 再结合特异性和灵敏度实验评价验证, 是获得特异检测靶点的有效方法, 可大批量筛选特异靶点。本研究筛选得到

15 对特异性强、灵敏度高的引物, 对应的靶点主要与沙门氏菌毒力岛(SPI) 基因相关。本文所选靶点编码Ⅲ型分泌系统蛋白(属于 SPI-2), 属内高度保守, 依据其设计的引物 SsaQ6 特异性好(表 1), 灵敏度高, 检测性能达到或超过 PS, FS23, *inv*A139-141^[2-3, 17] 等报道过的优秀引物。

EvaGreen 是代替 SYBR Green 的新一代荧光染料, 具有良好的 DNA 结合特性和熔解曲线分辨率, 并且对 PCR 抑制性小, 稳定好^[20-21], 适用于染料荧光

定量 PCR 的建立。本研究建立的沙门氏菌 EvaGreen 荧光定量 PCR 检测体系,检测限为 2.76 拷贝/PCR,与 Malorny,Chen 等人建立的 TaqMan 荧光定量 PCR 的检测水平相当(3–8 cfu/PCR,1 拷贝 \approx 1 cfu)^[22–24],比常规 PCR 降低一个数量级,并且引物特异性不受影响,检测结果呈现良好的重复性和可靠性(表 4)。

复杂的食品成分、培养基成分以及残留的 DNA 提取试剂等抑制因子,可能会对 PCR 反应产生抑制作用,影响检测结果的准确性^[25]。因此,在检测体系中添加用于指示反应抑制情况的扩增内标则显得尤为重要。本研究提供了一条竞争性扩增内标,其与目的基因之间的同源性非常低,两者不会通过互补链的结合而交联在一起而影响检测灵敏度;其扩增产物与目标产物相差约 100 bp,在染料法荧光定量 PCR 中,可以通过熔解峰来区分^[26–28],达到指示假阴性的目的;同时,它与 DNA 模板竞争扩增引物,避免了非竞争性内标的引物干扰问题。但是,需要优化控制内标的添加量,如图 3 所示,内标添加量低于 353 拷贝/PCR 时,几乎不会对灵敏度造成影响。最终,荧光定量 PCR 检测体系的灵敏度为 2.76 拷贝/PCR,对人工污染牛奶样品进行检测,初始接菌量为 0.4–0.6 cfu/10 mL,增菌 10 h 即可检出沙门氏菌,与文献报道相符^[6,16,24]。

综上所述,本研究的结果表明:筛选性能优异的靶点,添加扩增内标,均有助于减少假阴性、假阳性结果,提高 PCR 检测的可信度;扩增内标在 EvaGreen 荧光定量 PCR 检测体系中也可以起到指示假阴性的效果,不影响灵敏度和定量分析;与常规内标 PCR 体系相比,添加有扩增内标的荧光定量 PCR 体系,重复性更好,灵敏度更高,快速方便,并可以实现准确定量,同时,省略了凝胶电泳检测过程,实验操作更加安全;与探针法荧光定量技术相比,其成本更低,操作更方便,适合 PCR 技术的标准化推广。

参考文献

[1] 曹芳芳,徐德顺,沈樟. 实时荧光定量 PCR 法与常规 PCR 法检测沙门菌的比较. 中国卫生检验杂志(*Chinese Journal of Health Laboratory Technology*), 2008, 18(12): 2775–2776.

[2] 向雪菲,刘斌,张利达,史贤明. 食品中沙门氏菌分子检测靶点的筛选与评价. 微生物学报(*Acta Microbiolo-*

gica Sinica), 2008, 48(7): 941–946.

- [3] Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 1992, 6(4): 271–279.
- [4] Halatsi K, Oikonomou I, Lambiri M, Mandilara G., Vatopoulos A, Kyriacou A. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdiA*. *Fems Microbiology Letters*, 2006, 259(2): 201–207.
- [5] Kwang J, Littledike ET, Keen JE. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*, 1996, 22(1): 46–51.
- [6] Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 290–296.
- [7] Rahman H. Prevalence of enterotoxin gene (*stn*) among different serovars of *Salmonella*. *The Indian journal of medical research*, 1999, 110: 43–46.
- [8] Ziemer CJ, Steadham SR. Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. *Letters in applied microbiology*, 2003, 37(6): 463–469.
- [9] 何晓华,余水静,陈万义,施春雷,孟江洪,史贤明. 添加有扩增内标的副溶血弧菌 PCR 检测方法. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50(3): 387–394.
- [10] 李莉,蒋作明. PCR 技术在食品沙门氏菌检测中的应用. 食品科技(*Food Science and Technology*), 2002, 4: 60–62.
- [11] 卢强,陈贵连,林万明. PCR 扩增 *invA* 基因特异性检测沙门氏菌. 中国兽医学(*Chinese Journal of Veterinary Science*), 1994, 14(3): 251–256.
- [12] Malorny B, Tassios PT, Radstrom P, Cook N, Wagner M, Hoorfar J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 83(1): 39–48.
- [13] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Genome Research*, 1996, 6(10): 986–994.
- [14] 陈军. 实时荧光定量 PCR 方法在沙门菌鉴定及筛选中的应用. 职业与健康(*Occup and Health*), 2010, 26(4): 364–366.

- [15] 施林祥, 李东辉. 实时荧光 PCR 研究新进展. 世界华人消化杂志 (*World Chinese Journal of Digestology*), 2005, 13(5): 596-599.
- [16] 刘斌, 史贤明. 扩增内标在沙门氏菌 PCR 检测方法中的应用. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2006, 33(2): 156-161.
- [17] 石晓路. 沙门氏菌荧光 PCR 快速检测方法的建立与应用. 华中农业大学学位论文. 2003.
- [18] Siebert PD, Larrick JW. PCR MIMICS: competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *Biotechniques*, 1993, 14(2): 244-249.
- [19] McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton S, W, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du FY, Hou SF, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R, Wilson RK. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *Nature*, 2001, 413(6858): 852-856.
- [20] Mao F, Leung WY, Xin X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnology*, 2007, 7(76).
- [21] Sang F, Ren J. Capillary electrophoresis of double-stranded DNA fragments using a new fluorescence intercalating dye EvaGreen. *Journal of Separation Science*, 2006, 29(9): 1275-1280.
- [22] Chen J, Zhang L, Paoli GC, Shi C, Tu SI, Shi XM. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 137(2-3): 168-174.
- [23] Malorny B, Bunge C, Helmuth R. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 70(2): 245-251.
- [24] Malorny B, Paccassoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, Helmuth R. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7046-7052.
- [25] Fan W, Hamilton T, Webster-Sesay S, Nikolich MP, Lindler LE. Multiplex real-time SYBR Green I PCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria. *Molecular and Cellular Probes*, 2007, 21(4): 245-256.
- [26] Hernández M, Rodríguez-Lázaro D, Esteve T, Prat S, Pla M. Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Analytical Biochemistry*, 2003, 323(2): 164-170.
- [27] Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 1997, 245(2): 154-160.
- [28] Ferretti R, Mannazzu I, Coccolin L, Comi G, Clementi F. Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(2): 977-978.

Establishment and evaluation of a real-time IAC-PCR for the detection of *Salmonella*

Xianlong Dan, Bin Liu, Lida Zhang, Xiaoling Li, Chunlei Shi, Min Zhou, Xianming Shi*

Joint Sino-US Food Safety Research Center and Bor Luh Food Safety Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

Abstract [Objective] The aim of this study was to establish a new EvaGreen real-time IAC-PCR for the rapid detection of *Salmonella*. **[Methods]** We used *Salmonella* genomic comparison analysis to mine *Salmonella*-specific targets, and Primer Premier 5.0 to design primers which were evaluated by specificity and sensitivity tests. **[Results]** We obtained a *Salmonella*-specific gene that encodes putative type III secretion protein (*ssaQ*), and specific primers (*SsaQ6L/SsaQ6R*) were designed based on this gene. Then we established IAC-PCR and EvaGreen real-time IAC-PCR assays, which showed 100% inclusivity and 100% exclusivity on all strains tested. Their detection limits of purified *Salmonella* genomic DNA were 14.9 copies/PCR and 2.76 copies/PCR respectively. Artificial contamination assays showed that *Salmonella* could be detected after 10 hours and 8 hours enrichment when the original bacterial concentration was 4.2 cfu/10 mL. **[Conclusion]** A new EvaGreen real-time IAC-PCR with high specificity and sensitivity was successfully developed for the rapid detection of *Salmonella*.

Keywords: *Salmonella*, Target mining, EvaGreen real-time PCR, Internal amplification control (IAC)

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China General Projects (30771792, 31000779) and by the National Key Technology Research and Development Program (2009BADB9B01)

* Corresponding author. Tel: +86-21-34206616; E-mail: xmshi@sjtu.edu.cn

Received: 10 February 2011/Revised: 4 May 2011

《微生物学报》投稿方式

从 2006 年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿: 请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿, 请先进行“注册”, 注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿, 则可直接投稿。如果忘了用户名和密码, 请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执: 编辑部看到远程投稿后, 当日或者次日给作者发“收稿回执”, 通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审: 编辑看到远程投稿后, 还要对稿件进行内审。内审会有 2 个结果, 直退或受理, 请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 邮寄纸样: 为了保护知识产权, 务必请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板); 为了核实文中的图、表等内容, 还需要提供一份纸质稿件。
- (5) 受理费: 100 元审稿费。按照“稿件受理通知”中提供的详细地址办理, 务必通过邮局汇款, 切忌夹在纸样材料中随信邮寄 【为了便于查找, 请在汇款单上注明“稿件编号”。】